

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Avaliação dos efeitos do antígeno B de *Echinococcus granulosus* sobre
células de mamíferos em cultura**

Dissertação de Mestrado

Edileuza Danieli da Silva

Porto Alegre, março de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Avaliação dos efeitos do antígeno B de *Echinococcus granulosus* sobre
células de mamíferos em cultura**

Edileuza Danieli da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Dr. Arnaldo Zaha

Porto Alegre, março de 2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos e no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Arnaldo Zaha, pela dedicação e atenção na orientação deste trabalho.

Aos professores Augusto Schrank e Henrique Bunselmeyer Ferreira pela participação na minha Comissão de Acompanhamento e pelas sugestões que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Martín Cancela e à Dra. Karina Mariante Monteiro pelas valiosas sugestões na realização dos experimentos.

À banca examinadora pela leitura cuidadosa deste trabalho.

À aluna de Iniciação Científica Fernanda Zilli Fermino, pela dedicação e auxílio nos experimentos.

À equipe do Uniprote-MS (CBiot), em especial à Jozi, pelo suporte nas análises de LC-MS/MS e pela disposição em ajudar sempre que “estamos em apuros”.

Aos professores que gentilmente nos forneceram as linhagens celulares utilizadas neste trabalho, Prof. Mara Rosenzvit, pelas células RH, Prof. Marilene Vainstein, pelas A549 e J774 e Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior, pelas NIH/3T3.

Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, especialmente à Silvinha e ao Luciano, pelo auxílio e disposição em esclarecer as mais diversas dúvidas.

Aos colegas, estudiosos do “*Echinococcus*” e do “*Mesocestoides*”, Guilherme dos Santos, Filipe, William, Tati, Cibele, João, Duda, Aline, Bruna, Guilherme Barros, Sérgio, Karina L., Gabriela e Jefferson, por compartilharem os melhores (e os piores também!) momentos ao longo deste trabalho, pela companhia alegre e paciência em ouvir todas as minhas “teorias furadas”.

Às “meninas do *Mycoplasma*” Fernanda L., Nina, Jéssica e Veri pelo carinho e amizade.

Às pessoas especiais da minha vida, Daiani, Carol C., Carol K., Laís e Robson, pela amizade, carinho e companheirismo.

À minha família pela confiança e apoio dedicados a mim em todos os momentos.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| AGRADECIMENTOS | 4 |
| Sumário..... | 5 |
| Lista de abreviaturas, siglas e símbolos..... | 7 |
| Lista de figuras | 9 |
| Lista de tabelas | 10 |
| Resumo..... | 11 |
| Abstract | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 O gênero <i>Echinococcus</i> | 13 |
| 1.1.1 <i>E. granulosus</i> e a hidatidose cística | 14 |
| 1.1.2 Epidemiologia..... | 15 |
| 1.2 Interface parasito-hospedeiro..... | 17 |
| 1.2.1 Antígeno B..... | 18 |
| 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS..... | 21 |
| 2.1 Objetivo geral | 21 |
| 2.1.1 Objetivos específicos..... | 22 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 Coleta de material biológico | 23 |
| 3.2 Imunoblot..... | 23 |
| 3.3 Purificação do AgB de <i>E. granulosus</i> | 24 |
| 3.4 Espectrometria de massas | 25 |
| 3.5 Gel nativo BN-PAGE | 26 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.6 | Cultura celular | 26 |
| 3.7 | Ensaio de MTT | 27 |
| 3.8 | Contagem de células em hemocítômetro | 27 |
| 3.9 | Imunofluorescência | 28 |
| 3.10 | Análise estatística | 28 |
| 4 | RESULTADOS..... | 29 |
| 4.1 | Purificação do AgB de <i>E. granulosus</i> | 29 |
| 4.2 | Composição de subunidades dos oligômeros do AgB | 30 |
| 4.3 | Efeito do AgB sobre células de mamíferos em cultura..... | 33 |
| 4.4 | O AgB é internalizado por diferentes linhagens celulares..... | 36 |
| 4.4.1 | Mecanismos de endocitose estão envolvidos na internalização do AgB..... | 38 |
| 5 | DISCUSSÃO | 39 |
| 6 | PERSPECTIVAS..... | 45 |
| | REFERÊNCIAS..... | 46 |
| | ANEXO I – CURRICULUM VITÆ resumido..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|----------|--|
| AgB | antígeno B |
| AgB8 | Subunidade(s) de 8 kDa do antígeno B |
| AgB8/1 | subunidade 1 do antígeno B |
| AgB8/2 | subunidade 2 do antígeno B |
| AgB8/3 | subunidade 3 do antígeno B |
| AgB8/4 | subunidade 4 do antígeno B |
| AgB8/5 | subunidade 5 do antígeno B |
| BN-PAGE | do inglês, <i>blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| BSA | albumina sérica bovina |
| DALY | do inglês, <i>disability-adjusted life years per annum</i> |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DMEM | do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> |
| DPA | Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal |
| DTT | ditiotreitól |
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| HEPES | ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico |
| HLBP | proteína que liga compostos hidrofóbicos |
| HypF-N | domínio amino terminal da proteína HypF de <i>Escherichia coli</i> |
| IgG | imunoglobulina G |
| LC-MS/MS | cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem |
| LDL | lipoproteína de baixa densidade |
| LDLR | receptor de proteína de baixa densidade |
| MEM | do inglês, <i>Eagle's minimum essential medium</i> |
| MTT | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| MWCO | do inglês, <i>molecular weight cut off</i> |
| NF-κB | fator nuclear κB |
| PAIR | do inglês, <i>puncture, aspiration, injection, re-aspiration</i> |
| PBMC | células mononucleares de sangue periférico |
| PBS | tampão fosfato-salino |
| SDS | dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS |
| Seapa/RS | Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do estado do Rio Grande do Sul |
| Th0 | linfócito T auxiliar não ativado |

| | |
|-------------------|---|
| Th1 | linfócito T auxiliar do tipo 1 |
| Th2 | linfócito T auxiliar do tipo 2 |
| WHO | do inglês, <i>World Health Organization</i> |
| α -IgG | anticorpo contra imunoglobulina G |
| α -rAgB8/1 | anticorpo contra a subunidade 1 do antígeno B |
| α -rAgB8/2 | anticorpo contra a subunidade 2 do antígeno B |
| α -rAgB8/4 | anticorpo contra a subunidade 4 do antígeno B |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura esquemática do cisto hidático de <i>E. granulosus</i> | 15 |
| Figura 2. Distribuição mundial de <i>E. granulosus</i> | 16 |
| Figura 3. Análise por imunoblot do conteúdo de AgB nas amostras de líquido hidático coletadas a partir de cistos individuais de <i>E. granulosus</i> | 29 |
| Figura 4. Purificação do AgB do líquido hidático #348 de <i>E. granulosus</i> | 30 |
| Figura 5. Gel nativo BN-PAGE para o AgB #348 de <i>E. granulosus</i> | 33 |
| Figura 6. Capacidade de conversão de MTT de células em cultura após 24 h de incubação com diferentes concentrações de AgB..... | 34 |
| Figura 7. Efeito do AgB sobre o número de células A549 após diferentes tempos de tratamento..... | 35 |
| Figura 8. Número de duplicações da população de células A549 tratadas com 25 µg/ml de AgB..... | 36 |
| Figura 9. Oligômeros do AgB são internalizados por células de mamíferos em cultura..... | 37 |
| Figura 10. Inibição da internalização do AgB em baixas temperaturas..... | 38 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de líquido hidático (LH) coletadas a partir de cistos individuais de *E. granulosus* 23

Tabela 2. Identificação das subunidades do AgB presentes nas frações purificadas por cromatografia de imunoafinidade a partir do líquido hidático #360 31

Tabela 3. Identificação das subunidades do AgB presentes nas frações purificadas por cromatografia de imunoafinidade a partir do líquido hidático #348 32

RESUMO

A hidatidose cística é uma zoonose causada pelo estágio larval (cisto hidático) do *Echinococcus granulosus*. O cisto hidático desenvolve-se nas vísceras dos hospedeiros intermediários como uma estrutura unilocular preenchida pelo líquido hidático, que contém os produtos de excreção/secreção do parasito. O antígeno B (AgB) de *E. granulosus*, um dos principais componentes antigênicos do líquido hidático, é uma lipoproteína oligomérica composta por subunidades de 8 kDa. Em solução o AgB existe como distintos oligômeros e agregados em equilíbrio, contudo, os oligômeros de aproximadamente 160 kDa são predominantes. A função do AgB não é totalmente clara, mas dois papéis principais são sugeridos: de molécula imunomoduladora e de carreador de lipídios. Neste estudo, nós investigamos se o AgB é capaz de interagir com diferentes tipos celulares e afetar sua viabilidade. O AgB foi purificado por cromatografia de imunoafinidade a partir de líquido hidático coletado de cistos hidáticos individuais. A internalização do AgB pelas linhagens A549 (célula epitelial de pulmão), NIH/3T3 (fibroblasto), RH (hepatócito) e J774 (macrófago) foi avaliada por imunofluorescência. A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de redução do MTT após incubação com AgB por 24 h. As quatro linhagens celulares foram capazes de internalizar o AgB a 37°C. Para avaliar o envolvimento de endocitose na internalização, células RH foram incubadas com AgB a 4°C, condição que inibe processos de endocitose. Nessa condição, o AgB não foi observado no citoplasma celular, sugerindo que vias de endocitose poderiam estar envolvidas. Células RH e A549 mostraram maior sensibilidade no ensaio de MTT. A taxa de redução de MTT no tratamento com 100 µg/ml de AgB foi de 68% e 57% para RH e A549, respectivamente. Nas mesmas condições, células NIH/3T3 e J774 mostraram respostas similares, o nível de redução do MTT foi 80% e 78%, respectivamente. A sensibilidade observada para as células A549 e RH poderia estar relacionada ao organotropismo por pulmões e fígado reportado na hidatidose cística. A internalização pelas células pode ser uma etapa necessária para a função do AgB como carreador de lipídios ou molécula imunomoduladora e durante esse processo, o AgB poderia causar dano celular nos tecidos do hospedeiro.

Palavras-chave: *Echinococcus granulosus*, antígeno B, endocitose

ABSTRACT

Cystic hydatid disease is a zoonosis caused by the larval stage (hydatid cyst) of *Echinococcus granulosus*. The hydatid cyst develops in the viscera of intermediate host as a unilocular structure filled by the hydatid fluid, which contains parasitic excretory/secretory products. *E. granulosus* antigen B (AgB), one of the major antigenic component of hydatid fluid, is an oligomeric lipoprotein composed by small subunits with approximately 8 kDa. In solution, AgB exists as distinct oligomers and aggregates in equilibrium, however oligomers with approximately 160 kDa are prevalent. The AgB function is not completely clear, but two major roles are suggested: as an immunomodulatory molecule and as a lipid carrier. In this study, the ability of AgB to interact with different cell types and to affect cell viability was investigated. AgB was purified by immunoaffinity chromatography from hydatid fluid collected from individual hydatid cysts. The internalization of AgB by A549 (lung epithelial cell), NIH/3T3 (fibroblast), RH (hepatocyte) and J774 (macrophage) cells was evaluated by immunofluorescence. Cell viability was analyzed by MTT reduction assay after incubation with AgB by 24 h. The four cell lines tested were able to internalize AgB at 37°C. In order to evaluate the role of endocytosis in the internalization, RH cells were incubated with AgB at 4°C, condition that inhibits endocytosis processes. In this condition, AgB was not visualized on cell cytoplasm, suggesting that endocytosis pathways could be involved. RH and A549 cells showed higher sensitivity on MTT assay. The MTT reduction level on the 100 µg/ml AgB treatment was 68% and 57% for RH and A549, respectively. In the same condition, NIH/3T3 e J774 cells showed similar responses, the MTT reduction level was 80% and 78%, respectively. The observed sensitivity on A549 and RH cells could be related to the organothropism by lungs and liver reported on cystic hydatid disease. The internalization by cells might be a necessary step to the AgB function as a lipid carrier or an immunomodulatory molecule and during this process, AgB could cause cell damage to the host tissues.

Keywords: *Echinococcus granulosus*, antigen B, endocytosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Echinococcus*

Os helmintos do gênero *Echinococcus* são endoparasitas obrigatórios pertencentes à classe Cestoda, família Taeniidae, cujo ciclo vital é dependente da associação presa-predador entre dois hospedeiros mamíferos obrigatórios (NAKAO *et al.*, 2013). Carnívoros (canídeos ou felídeos) são os hospedeiros definitivos e suas presas herbívoras são os hospedeiros intermediários. O estágio larval de *Echinococcus* spp., o cisto hidático ou metacestódeo, apresenta-se em três formas básicas diferentes, dependendo da espécie: unilocular, alveolar ou policístico (NAKAO *et al.*, 2013).

A taxonomia do gênero *Echinococcus* está em processo de atualização e estudos recentes, baseados em filogenética, estabeleceram nove espécies distribuídas mundialmente (NAKAO *et al.*, 2007, 2013; SAARMA *et al.*, 2009). As espécies *Echinococcus granulosus* (causadora da hidatidose cística) e *Echinococcus multilocularis* (causadora da hidatidose alveolar) possuem maior destaque considerando a sua importância médica e veterinária (ECKERT; DEPLAZES, 2004; MORO; SCHANTZ, 2009).

As espécies *Echinococcus equinus*, *Echinococcus canadensis* e *Echinococcus ortleppi*, também causadoras de hidatidose cística, têm maior relevância para a veterinária, pois afetam em maior grau a produção pecuária. Em relação à hidatidose cística em humanos, *E. granulosus* responde por 88,44% dos casos. O restante é atribuído principalmente ao *E. canadensis* (11,07%) e raros casos relatados na literatura (5 no total) são de *E. ortleppi* (ALVAREZ ROJAS *et al.*, 2014).

Também compõem o gênero as espécies neotrópicas, *Echinococcus oligarthrus* e *Echinococcus vogeli*, causadoras da hidatidose unicística e policística, respectivamente (D'ALESSANDRO; RAUSCH, 2008; MORO; SCHANTZ, 2009; SANTOS *et al.*, 2012), e as espécies *Echinococcus shiquicus* e *Echinococcus felidis*, as quais ainda não tiveram seu potencial zoonótico determinado (NAKAO *et al.*, 2013).

1.1.1 *E. granulosus* e a hidatidose cística

A hidatidose cística é mantida principalmente pelo ciclo doméstico de *E. granulosus*, onde o cão é o hospedeiro definitivo e herbívoros ungulados são os hospedeiros intermediários. O contato direto com cães infectados ou o consumo de vegetais ou água contaminados com suas fezes são importantes meios de transmissão ao ser humano (WHO, 2010).

A forma adulta do parasito vive no intestino delgado do hospedeiro definitivo e consiste em um pequeno verme que mede entre 2 e 7 mm de comprimento. O corpo se divide em escólex (cabeça) e estróbilo (corpo), sendo o escólex um órgão de fixação especializado constituído por quatro ventosas e um rostelo com pequenos ganchos. O estróbilo é dividido em proglótides, onde a última contém os ovos maduros.

O hospedeiro definitivo libera no ambiente, juntamente com suas fezes, os ovos do verme. Quando ingeridos pelos hospedeiros intermediários, os ovos liberam a oncosfera. Esta penetra a mucosa intestinal e é transportada através das vias linfáticas ou venosas até as vísceras, onde se diferencia na forma larval ou cisto hidático (MCMANUS *et al.*, 2003).

O cisto hidático (Fig. 1) desenvolve-se nas vísceras do hospedeiro intermediário e consiste em uma estrutura unilocular, preenchida por líquido hidático, contendo em seu interior os protoescólices, formas pré-adultas infectivas para o hospedeiro definitivo (CAMERON; WEBSTER, 1969). A parede do cisto é composta por duas camadas. A camada externa, acelular e rica em carboidratos, é denominada laminar. A camada que reveste o cisto internamente, denominada germinativa, é formada por células que proliferam e se diferenciam para dar origem às cápsulas prolíferas e aos protoescólices (MCMANUS *et al.*, 2003). O hospedeiro definitivo infecta-se ao se alimentar de vísceras contendo cistos hidáticos.

Os órgãos predominantemente afetados pela hidatidose cística são fígado e pulmão. A sintomatologia é bastante variável, dependendo do órgão afetado, do tamanho e localização do cisto, da interação com o tecido adjacente, de

complicações resultantes da ruptura do cisto e da resposta inflamatória do hospedeiro (KERN, 2003).

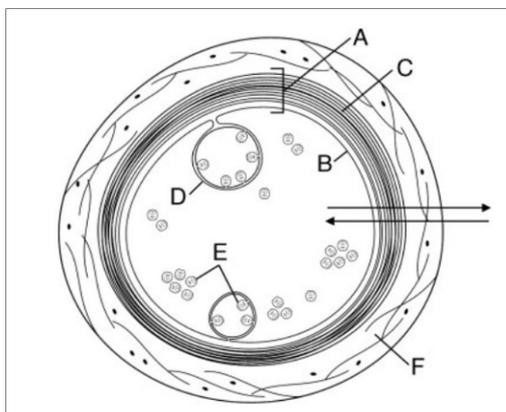


Figura 1. Estrutura esquemática do cisto hidático de *E. granulosus*. (A) Parede do cisto: composta por B e C. (B) Camada germinativa: tecido proliferativo do cisto, origina C, D e E. (C) Camada laminar: camada acelular protegendo externamente o cisto. (D) Cápsula prolífera: vesícula que brota da camada germinativa e origina E em seu interior. (E) Protoescolices: forma pré-adulta. (F) Capa adventícia: tecido do hospedeiro, resultado da resposta inflamatória. Adaptado de Monteiro *et al.* (2010).

Em seres humanos, o diagnóstico da hidatidose em estágios mais avançados é feito por técnicas de imagem, como ultrassonografia e tomografia computadorizada (BARNES *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012). Em estágios iniciais pode ser usado o diagnóstico sorológico, pois mesmo em uma infecção assintomática o hospedeiro produz uma resposta humoral detectável (ZHANG *et al.*, 2012).

O tratamento da hidatidose cística consiste, principalmente, em remoção cirúrgica ou tratamento pela técnica chamada PAIR (do inglês *puncture, aspiration, injection, re-aspiration*) e/ou tratamento com altas doses, por um período prolongado, com medicamentos antiparasitários (WHO, 2010).

1.1.2 Epidemiologia

A hidatidose cística é uma zoonose de distribuição global (Fig. 2), que representa um problema sério de saúde pública humana e animal, com considerável impacto sócio-econômico (BUDKE *et al.*, 2006; WHO, 2010). Em

2010 a Organização Mundial da Saúde incluiu a hidatidose na lista das doenças tropicais negligenciadas.

Estimativas sugerem uma perda de 1-3 milhões de DALYs (*disability-adjusted life years per annum*) devido à hidatidose cística. Além disso, os custos de tratamento aliado às perdas econômicas para a pecuária chegam a US\$ 2 bilhões anuais (TORGERSON; CRAIG, 2011).

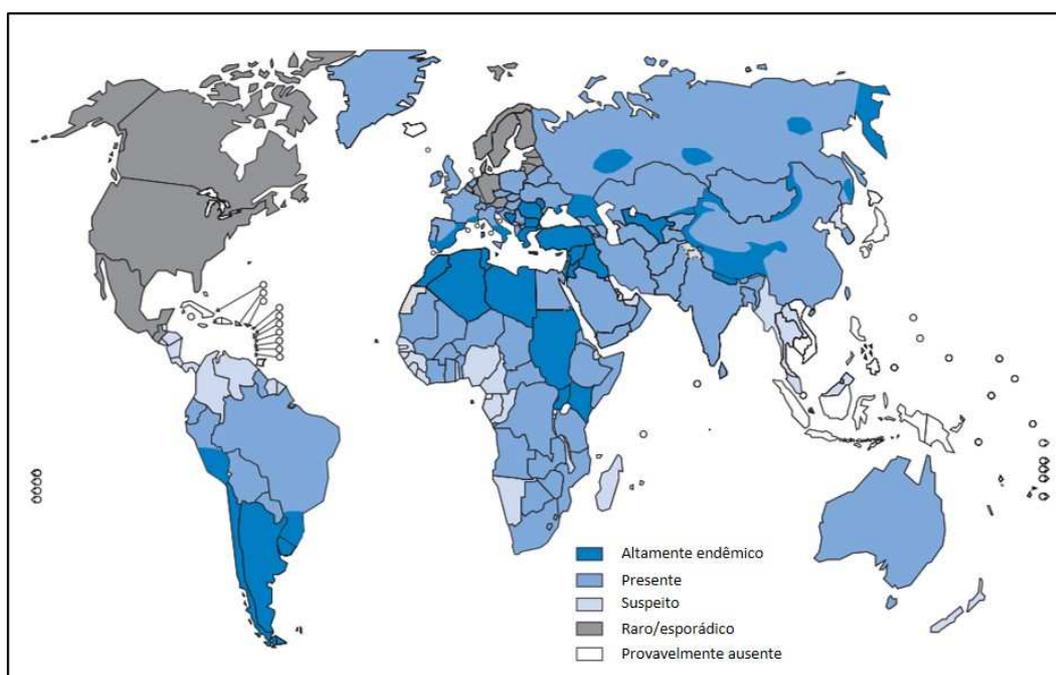


Figura 2. Distribuição mundial de *E. granulosus*. Adaptado de WHO (2010).

Na América do Sul, estima-se que a prevalência da hidatidose cística em ovinos seja de 75% no Peru, 13,6% no Brasil, 9,8% no Uruguai, 9% na Argentina e 7,2% no Chile (CARDONA; CARMENA, 2013). O rebanho bovino também apresenta uma alta prevalência no Peru (80%), enquanto na Argentina, Brasil e Chile as taxas giram em torno de 12-20% (CARDONA; CARMENA, 2013).

No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul, em especial a fronteira com Argentina e Uruguai, é uma região considerada endêmica para a hidatidose. Segundo dados da Divisão de Fiscalização e Defesa Sanitária Animal (DPA) da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio (Seapa/RS), no período de 2001 a 2009, 10% dos bovinos e 25% dos ovinos abatidos em matadouros fiscalizados estavam parasitados.

As espécies de ocorrência predominante no Rio Grande do Sul são *E. granulosus* e *E. ortleppi*. De acordo com de la Rue *et al.* (2006) 100% das infecções em ovinos são por *E. granulosus*. Em contrapartida, em bovinos, 56,6% das infecções são por *E. granulosus* e 43,4% são por *E. ortleppi* (BALBINOTTI *et al.*, 2012).

Em relação à infecção em humanos, no período de 2000 a 2012, um total de 47 pessoas foram internadas no Rio Grande do Sul com hidatidose cística, de acordo com dados do Programa Estadual de Vigilância da Hidatidose. Entretanto, esses números são subestimados, sabe-se que a hidatidose cística humana apresenta prevalências muito mais elevadas em certas áreas (FARIAS *et al.*, 2004; DE LA RUE, 2008). Além disso, a doença se tornou de notificação compulsória no Rio Grande do Sul somente em 2010.

1.2 Interface parasito-hospedeiro

Parasitas como o *E. granulosus* são capazes de estabelecer uma infecção crônica, podendo sobreviver por décadas no organismo hospedeiro. Para tal, desenvolveram um amplo repertório de estratégias, tanto para evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro, como para captação de nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. A relação parasito-hospedeiro na hidatidose cística é interativa e o desfecho da infecção é o resultado do balanço entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e as estratégias de sobrevivência do parasito (SIRACUSANO *et al.*, 2012a).

O líquido hidático contém os produtos de excreção/secreção do parasito, assim como, proteínas do hospedeiro, indicando que existe comunicação entre o cisto e o tecido hospedeiro. Em *E. granulosus*, foram identificadas diversas proteínas, produtos de excreção/secreção, cujas funções estão relacionadas à processos importantes para a sobrevivência do parasito, como imunomodulação, proteção contra danos oxidativos e moléculas carreadoras (MONTEIRO *et al.*, 2010; VIRGINIO *et al.*, 2012).

1.2.1 Antígeno B

O antígeno B (AgB) é um dos principais componentes do líquido hidático e foi primeiramente descrito como uma lipoproteína termoestável de 120-160 kDa. No entanto, a presença de agregados indica que o AgB existe como distintas formas em equilíbrio (ORIOLE *et al.*, 1971; ORIOLE; ORIOLE, 1975; MONTEIRO *et al.*, 2012). Sob condições redutoras e desnaturantes, o AgB dissocia em componentes de 8, 16, 24 e 32 kDa, onde se observa uma redução da abundância relativa proporcional ao aumento da massa molecular (LIGHTOWLERS *et al.*, 1989). Trata-se, portanto, de uma proteína oligomérica formada por subunidades de 8 kDa. Cinco subunidades distintas são descritas para o AgB: AgB8/1 (FROSCH *et al.*, 1994), AgB8/2 (FERNÁNDEZ *et al.*, 1996), AgB8/3 (CHEMALE *et al.*, 2001), AgB8/4 (AREND *et al.*, 2004) e AgB8/5 (MAMUTI *et al.*, 2007). Os genes que codificam as subunidades do AgB fazem parte de uma família multigênica (CHEMALE *et al.*, 2001) e apresentam um alto grau de polimorfismo entre diferentes espécies do gênero (MUZULIN *et al.*, 2008). No genoma de *E. granulosus* foram identificados sete *loci* de AgB, sendo uma cópia de cada de AgB8/1, AgB8/2, AgB8/4 e AgB8/5 e três cópias de AgB8/3 (Olson *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013). Os genes de AgB formam um *cluster* que, por sua vez, é flanqueado por um gene conservado em cestódeos e que possui alta homologia com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) (Olson *et al.*, 2012).

O líquido hidático possui uma quantidade expressiva de AgB, este é produzido pelas células da camada germinativa e protoescólicas e secretado no interior do cisto hidático (DAVIES *et al.*, 1978; SÁNCHEZ *et al.*, 1991). Estruturalmente o AgB apresenta distintos estados oligoméricos (MONTEIRO *et al.*, 2012). Análises tridimensionais por microscopia de força atômica demonstraram que os oligômeros do AgB apresentam uma forma quase globular e são heterogêneos em tamanho e morfologia (MONTEIRO *et al.*, 2012). Quanto à composição de subunidades, Monteiro *et al.* (2012) analisaram, por espectrometria de massas, amostras de AgB purificado de diferentes cistos e encontraram todas as subunidades, com exceção da subunidade AgB8/5. Esses

mesmos autores demonstraram que existem diferenças quantitativas na composição de subunidades em diferentes amostras de AgB de *E. granulosus*. Entretanto, ainda não se sabe onde ou quando ocorre a formação dos oligômeros, se ainda dentro das células ou após a secreção da proteína.

A função do AgB ainda não é totalmente clara, mas a presença de grandes quantidades no líquido hidático sugerem um papel importante na biologia do parasito (MUSIANI *et al.*, 1978; MONTEIRO *et al.*, 2010; AZIZ *et al.*, 2011). Uma característica peculiar da interação *Echinococcus*-hospedeiro é que a infecção crônica coexiste com uma detectável resposta humoral e celular contra o parasito, cuja sobrevivência depende de mecanismos eficientes de evasão da resposta imune. Nesse contexto, diversos estudos apontam uma função imunomoduladora para o AgB, capaz de interferir na resposta imune inata e adaptativa (SIRACUSANO *et al.*, 2008a).

Shepherd *et al.* (1991) demonstraram, através de estudos *in vitro*, que o AgB é capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos, função importante para a viabilidade do parasito frente à resposta imune do hospedeiro. Virginio *et al.* (2007) mostraram que o AgB provoca uma redução na produção de peróxido de hidrogênio em neutrófilos e sugerem um mecanismo de evasão importante em caso de ruptura do cisto, onde o protoescólex poderia originar um novo cisto. Siracusano *et al.* (2008b) relataram que o AgB induz um aumento nas taxas de apoptose em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com hidatidose cística ativa.

O AgB atua interferindo nas funções de monócitos/macrófagos e células dendríticas do hospedeiro em diferentes maneiras (RIGANÒ *et al.*, 2007; SIRACUSANO *et al.*, 2008b). Monócitos tratados com AgB tem sua diferenciação em células dendríticas imaturas impedida ou alterada, tornando estas incapazes de responder à estímulos para maturação. Ainda em monócitos/macrófagos, o AgB reduz a translocação de NF- κ B para o núcleo, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (SILVA *et al.*, 2013).

A ativação de linfócitos T, na qual a razão Th1/Th2 é deslocada em favor de uma resposta Th2, é outro mecanismo de modulação utilizado pelo *E. granulosus* (RIGANÒ *et al.*, 2001, 2004). Riganò *et al.* (2004) obtiveram linhagens

de células T derivadas de pacientes com a doença ativa e inativa e encontraram que aquelas proveniente de pacientes com a doença inativa apresentavam uma forte resposta Th1, enquanto aquelas de pacientes com a doença ativa apresentaram uma resposta mista Th1/Th2/Th0, mas com predominância de Th2. Nesse contexto, o AgB modula a maturação de células dendríticas sentinelas, estas quando sensibilizadas com AgB polarizam a resposta celular para aquela do tipo Th2 (RIGANÒ *et al.*, 2007).

A expressiva resposta humoral produzida pelo hospedeiro contra o AgB na infecção por *E. granulosus*, fez dessa proteína um interessante alvo para imunodiagnóstico. Muitos trabalhos foram realizados para avaliar o valor do AgB no imunodiagnóstico da hidatidose cística e tanto o AgB nativo, como as subunidades recombinantes e peptídeos sintéticos apresentam alta sensibilidade e especificidade (GONZÁLEZ-SAPIENZA *et al.*, 2000; ROTT *et al.*, 2000; VIRGINIO *et al.*, 2003). O AgB está entre os antígenos de *E. granulosus* mais específicos para uso em testes sorodiagnósticos (ZHANG *et al.*, 2003; SIRACUSANO *et al.*, 2004; CARMENA *et al.*, 2006).

O AgB faz parte da família de lipoproteínas HLBP (hydrophobic ligand binding proteins) específica de cestódeos (LEE *et al.*, 2007; ALVITE; ESTEVES, 2012). HLBP são conhecidas pela abundância e imunogenicidade, bem como por sua estrutura oligomérica de alta massa molecular, composta por subunidades de 7-11 kDa que são ricas em α -hélices (ALVITE; ESTEVES, 2012). As HLBP podem ser intracelulares, como aquelas de *Moniezia expansa* (BARRETT *et al.*, 1997), ou extracelulares, como aquelas identificadas em *Taenia solium* (LEE *et al.*, 2007), bem como, o AgB de *Echinococcus* spp.

Como integrante da família das HLBP o AgB pode ter um importante papel como carreador de lipídios do hospedeiro para o parasito. Foi demonstrado, *in vitro*, que a molécula nativa deslipidada do AgB e as formas recombinantes das subunidades AgB8/1 e AgB8/2 são capazes de ligar análogos fluorescentes de ácido palmítico, mostrando a alta afinidade dessa proteína por ácidos graxos (CHEMALE *et al.*, 2005). Obal *et al.* (2012) analisaram a composição lipídica nativa do AgB purificado de cistos bovinos e humanos e encontraram que a porção lipídica representa entre 40 e 50% da massa total da lipoproteína. Obal *et*

al. (2012) também identificaram diferentes classes de lipídios associadas ao AgB, sendo as mais abundantes triacilglicerídeos, fosfolipídios (principalmente fosfatidilcolina) e colesterol. Sabendo-se que em *E. granulosus* a síntese *de novo* de ácidos graxos e esteróis não ocorre, esses resultados sugerem que o AgB atua na estabilização de lipídios insolúveis em uma partícula lipoproteica, o que permite o sequestro desses lipídios no tecido hospedeiro e sua posterior liberação para utilização pelo parasito (OBAL *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O AgB é uma das proteínas mais abundantes e imunogênicas do líquido hidático e seu caráter de excreção-secreção o torna ainda mais relevante para estudo, pois aumenta seu potencial de interações com moléculas do hospedeiro e de participação em mecanismos de sobrevivência do parasito. Evidências de estudos anteriores indicam que, entre outras funções, o AgB participa de mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro e da captação de lipídios cuja síntese não ocorre em *E. granulosus*, porém são essenciais ao seu desenvolvimento.

Entretanto, ainda pouco se sabe sobre que tipo de interação é necessário que ocorra entre a proteína e as células do hospedeiro, sejam elas de sistema imune ou do tecido que aloja o metacéstódeo, para que o AgB exerça seus efeitos. Investigar se o AgB interage com células do hospedeiro e afeta o metabolismo das mesmas é um importante passo para a elucidação dos mecanismos pelos quais essa proteína exerce sua função e auxilia na sobrevivência do parasito, contribuindo assim para o melhor entendimento do papel biológico do AgB de *Echinococcus* spp.

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a capacidade de interação do antígeno B de *Echinococcus granulosus* com células de mamíferos em cultura, buscando identificar mecanismos envolvidos na função desta proteína.

2.1.1 Objetivos específicos

- Identificar as subunidades presentes em oligômeros do AgB purificados de cistos hidáticos individuais de bovinos.
- Avaliar o efeito do AgB sobre a viabilidade de diferentes linhagens de células de mamíferos em cultura.
- Analisar a capacidade de internalização do AgB por células de mamíferos em cultura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material biológico

Vísceras bovinas contendo cistos hidáticos foram coletadas em um abatedouro da região metropolitana de Porto Alegre (RS) e submetidas à dissecação para obtenção do material biológico. O líquido hidático de cistos férteis (contendo protoescólices) individuais foi coletado por punção e aspiração e armazenado à -80°C até o momento de uso. Todos os cistos coletados em nosso laboratório recebem um número de identificação, permitindo o registro de informações como: cidade de origem do animal abatido, órgão de localização do cisto e a espécie, se *E. granulosus* ou *E. ortleppi*. Foram selecionadas para este trabalho apenas amostras de líquido hidático de *E. granulosus* com volume de no mínimo 50 ml (Tabela 1).

Tabela 1. Amostras de líquido hidático (LH) coletadas a partir de cistos individuais de *E. granulosus*. As amostras são identificadas pelo número do cisto coletado. A tabela traz o volume aproximado de LH coletado e o órgão em que o cisto estava localizado.

| LH | Volume (ml) | Órgão |
|------|-------------|--------|
| #227 | 220 | Pulmão |
| #330 | 140 | Fígado |
| #348 | 460 | Fígado |
| #360 | 170 | Pulmão |
| #362 | 100 | Pulmão |
| #370 | 350 | Pulmão |
| #405 | 115 | Pulmão |
| #411 | 80 | Pulmão |

3.2 Imunoblot

Alíquotas de 100 µl de cada amostra de líquido hidático coletado foram utilizadas para análise quanto a presença de AgB por imunoblot. As alíquotas de líquido hidático tiveram seu conteúdo proteico separado por SDS-PAGE 12%. A

eletroforese foi realizada em tampão Tris/Glicina/SDS (250 mM Tris; 1,92 mM glicina; 1% SDS) com voltagem constante de 100 V. Após a separação eletroforética o conteúdo proteico foi transferido para membranas de nitrocelulose (Hybond TMECLTM, Amersham) em sistema úmido com tampão Tris/Glicina/Metanol (23 mM Tris; 39 mM glicina; 20% metanol) à 70 V por 1 h e 30 min. Como solução bloqueadora foi utilizado PBS-T (PBS com 0,1% de Tween-20) contendo 5% de leite desnatado e como solução de lavagem apenas PBS-T. Como anticorpo primário foi utilizado um *pool* contendo anticorpos policlonais produzidos em nosso laboratório contra cada uma das versões recombinantes das subunidade do AgB (rAgB8/1-5). Como anticorpo secundário foi utilizado α -IgG de coelho conjugado à peroxidase (GE Healthcare) em uma diluição de 1:20.000. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário por 1 h e 30 min e com o anticorpo secundário por 1 h. Os blots foram revelados com o reagente de detecção ECL Plus (Pierce) e a quimioluminescência foi detectada usando o sistema de imagem VersaDoc (Bio-Rad).

3.3 Purificação do AgB de *E. granulosus*

As amostras de líquido hidático foram concentradas em filtros AMICON Ultra-15, MWCO 3 KDa (Millipore) para um volume de aproximadamente 30 ml e, em seguida, processadas para enriquecimento da fração de lipoproteínas conforme descrito por Oriol *et al.* (1971). Brevemente, o líquido hidático foi dialisado contra acetato de sódio 5 mM, pH 5, *overnight*. O material precipitado foi coletado por centrifugação (15.000 x g, 1 h) e ressuspendido em 20 ml de PBS, a seguir adicionou-se 40% de sulfato de amônio para uma nova precipitação, na qual as lipoproteínas, incluindo AgB, permanecem na fração solúvel.

A etapa posterior de purificação das amostras foi feita por cromatografia de imunoafinidade. Anticorpos policlonais, gerados previamente em nosso laboratório, contra as subunidades recombinantes rAgB8/1, rAgB8/2 e rAgB8/4 foram acoplados, separadamente, em resina *Sepharose*® ativada com brometo de cianogênio (GE Healthcare) para montagem de três colunas de imunoafinidade. Cada amostra a ser purificada foi dividida em três frações e cada

fração submetida à cromatografia em uma das colunas montadas. O material retido na coluna foi eluído com glicina 100 mM, pH 2,5, reunido novamente em uma única amostra (com exceção daquelas submetidas à espectrometria de massas) e dialisado contra tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4.

3.4 Espectrometria de massas

Amostras de AgB em solução (150 µg) foram, primeiramente, precipitadas em solução de acetona contendo 20% de ácido tricloroacético (TCA), ressuspendidas em tampão desnaturante (8 M de ureia, 25 mM de bicarbonato de amônio), reduzidas com DTT e alquiladas com iodoacetamida. Em seguida, a concentração de uréia foi reduzida para 1 M, pela adição de solução bicarbonato de amônio 25 mM, e adicionou-se 1,5 µg de tripsina (*Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade*, Promega). As amostras foram incubadas com tripsina por 4 h, à 37°C. Após esse tempo foi adicionado novamente a mesma quantidade de tripsina e a incubação prosseguiu por mais 16 h. Os peptídeos gerados foram dessalinizados utilizando-se colunas HLB® Waters (Oasis), liofilizados, solubilizados em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e então analisados.

Em uma segunda abordagem, 60 µg de cada fração da amostra #348 foram resolvidas em gel SDS-PAGE 4-16% (*Mini Protean TGx*, BioRad) e as bandas correspondentes à monômero, dímero e trímero foram excisadas. Os fragmentos de gel foram descorados por meio de sucessivas lavagens em solução 50% acetonitrila/25 mM bicarbonato de amônio e um último passo de lavagem com 100% de acetonitrila. A seguir, os fragmentos foram liofilizados em *Speed Vac* (Centrivap Concentrator - LABCONCO) e reidratados em solução 25 mM de bicarbonato de amônio contendo 10 µg/ml de tripsina e incubados por 16 h à 37°C. Por fim, os peptídeos foram extraídos com solução 50% acetonitrila/5% TFA, liofilizados, ressuspendidos em 0,1% de TFA e analisados.

As amostras foram analisadas por espectrometria de massas do tipo LC-MS/MS, na Unidade de Química de Proteínas e Espectrometria de Massas (Uniprote-MS) do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Os dados de massas resultantes foram analisados utilizando o programa MASCOT versão 2.2.1 (Matrix Science) e as buscas foram feitas em banco de dados local contendo as sequências de aminoácidos das cinco subunidades do AgB. Os parâmetros utilizados para a identificação das proteínas no programa MASCOT foram: máximo de uma perda de clivagem, carbamidometilação dos resíduos de cisteína como modificação fixa, oxidação de resíduos de metionina como modificação variável, 0,3 Da de tolerância de massa e nível de significância maior do que 0,05.

3.5 Gel nativo BN-PAGE

Alíquotas de 10 µg de proteína eluída de cada coluna de imunoafinidade foram resolvidas em gel de poliacrilamida BN-PAGE (*Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) 4-16% utilizando-se o sistema *NativePAGE* Novex® Bis-Tris (Invitrogen). A eletroforese foi feita à temperatura ambiente, a 150 V por 2 h. Foi adicionado ao tampão catódico 0,02% de Coomassie Blue G-250, que confere carga líquida negativa às proteínas, mas sem alterar sua conformação nativa (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1991).

3.6 Cultura celular

Células NIH/3T3 (fibroblastos de embrião de camundongo), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano) e RH (hepatoma de rato) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Células J774 (macrófagos de camundongo) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com MEM *Non-essential Amino acid solution* (Sigma Aldrich), 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio. Como antibióticos utilizou-se 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Todas as culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂.

3.7 Ensaio de MTT

O efeito do AgB sobre células A549, NIH/3T3, J774 e RH foi avaliado por ensaio de redução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). As células foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10^5 células/ml e na presença de diferentes concentrações de AgB (1-100 µg/ml). Como tratamento controle foi utilizado o mesmo volume de tampão fosfato de sódio 20 mM. As soluções de proteína e controle foram esterilizadas por filtração em 0,22 µm. Após 24 h de tratamento, foi adicionado 0,5 mg/ml de MTT à cada poço e incubado por 4 h posteriores. Para a solubilização dos cristais de formazan, 100 µl de solução de lise (dimetilformamida 50%/SDS 20%, pH 4,7) foi adicionada em cada poço e incubada *overnight* a 37°C. Os valores de absorbância foram determinados a 595 nm em leitor de placas Bio-Rad 550.

3.8 Contagem de células em hemocitômetro

Células da linhagem A549 foram cultivadas em placas de 6 poços a uma densidade inicial de 10^4 células/ml. O grupo tratado foi cultivado na presença de 25 µg/ml de AgB, enquanto ao grupo controle foi adicionado apenas tampão fosfato de sódio 20 mM. Após 24, 48 e 72 h o meio de cultura dos poços foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS e recuperadas com tripsina-EDTA 0,25% (Life Technologies). A tripsina foi inativada pela adição de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e as células imediatamente contadas em hemocitômetro. O número de duplicações celulares foi calculado com a seguinte fórmula: N° de duplicações = $[\log (N^{\circ}$ de células pós-tratamento/ N° inicial de células)] / $\log 2$, conforme descrito por Lorge *et al.* (2008). O número de células pós-tratamento corresponde ao número de células contadas após os diferentes tempos de incubação. O número inicial de células corresponde ao número de células no tempo imediatamente anterior.

3.9 Imunofluorescência

Células A549, NIH/3T3, J774 e RH foram cultivadas sobre lamínulas de microscopia (CultureWell™ SecureSlip™, Sigma-Aldrich) colocadas em placas de Petri de 35 mm de diâmetro. Após 4 h de incubação com 25 µg/ml de AgB (a 37°C ou 4°C, conforme indicado) as células foram lavadas com PBS (3x1 min), fixadas em paraformaldeído 4% e permeabilizadas com triton X-100 0,2%. Foi utilizado como solução de bloqueio e para diluição dos anticorpos BSA 5% em PBS-T 0,05% (PBS com 0,05% de Tween 20). Como anticorpo primário utilizou-se um *pool* de anticorpos policlonais gerados contra as subunidades recombinantes AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/4 em uma concentração de 2 µg/ml. Como anticorpo secundário foi utilizado α-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) em uma diluição de 1:250. As células foram incubadas *overnight* à 4°C com os anticorpos primários e por 1 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário. Para marcação dos núcleos foi utilizado 100 nM de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Molecular Probes) e para marcação de citoesqueleto foi utilizado 50 nM de faloidina conjugada a Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes). As imagens foram registradas em microscópio confocal LSM 710 Zeiss, disponível no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS).

3.10 Análise estatística

O programa SPSS (versão 20.0.0) foi utilizado para determinar a significância dos resultados pelos testes *t* de Student ou ANOVA de um fator seguido de *post hoc* de Tukey.

4 RESULTADOS

4.1 Purificação do AgB de *E. granulosus*

A purificação do AgB foi feita a partir de líquido hidático coletado de cistos individuais. As amostras de líquido hidático coletadas neste trabalho apresentaram variação na quantidade de AgB detectado no imunoblot. Amostras com grande diferença no volume total (Tabela 1) apresentaram também grande diferença na quantidade de AgB, como por exemplo, a amostra #370, com aproximadamente 350 ml e a amostra #411, com 80 ml (Fig. 3). Foram utilizadas para a purificação do AgB as amostras de líquido hidático #227, #360, #362, #348 e #370, pois apresentavam maior conteúdo de AgB, conforme determinado por imunoblot (Fig. 3).

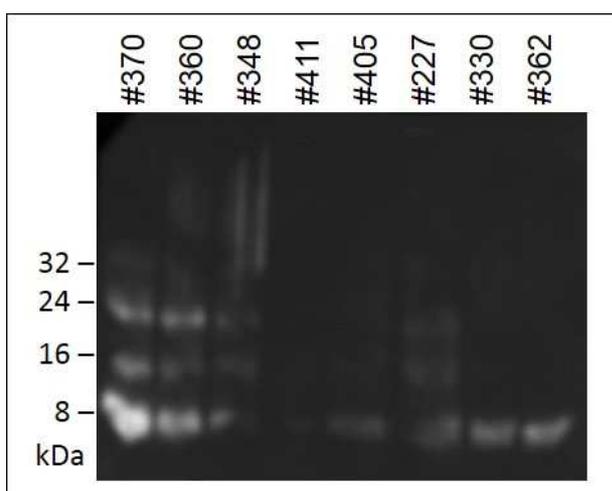


Figura 3. Análise por imunoblot do conteúdo de AgB nas amostras de líquido hidático coletadas a partir de cistos individuais de *E. granulosus*. Uma alíquota de cada amostra foi resolvida em gel de poliacrilamida e transferida para uma membrana de nitrocelulose. Para a visualização das bandas correspondentes ao AgB foi utilizado um *pool* de anticorpos policlonais gerados contra as subunidades do AgB. O número de identificação de cada amostra de líquido hidático está no topo da imagem. A massa molecular dos multímeros detectados está indicada à esquerda da imagem.

A figura 4 mostra os resultados das etapas de purificação do AgB nativo. Nas etapas iniciais de enriquecimento da fração lipoproteica já é possível observar a presença do AgB (Fig. 4A). Entretanto, também estão presentes outras proteínas, tanto do parasito como do hospedeiro, e para separar o AgB dessas proteínas foi utilizada cromatografia de imunoafinidade. A utilização dos anticorpos policlonais α -rAgB8/1, α -rAgB8/2 e α -rAgB8/4 permitiu a purificação do AgB livre de proteínas contaminantes (Fig. 4B).

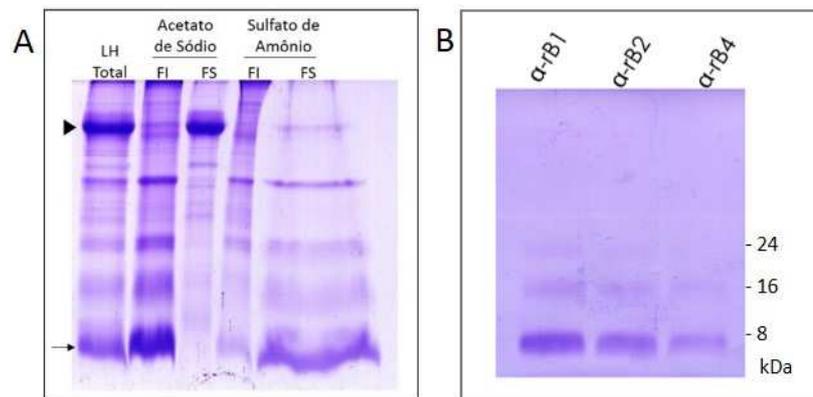


Figura 4. Purificação de AgB do líquido hidático #348 de *E. granulosus*. (A) Enriquecimento da fração de lipoproteínas. As frações obtidas após os passos de precipitação com acetato de sódio 5 mM e sulfato de amônio 40% estão indicadas no topo da imagem. *LH total*: Líquido hidático antes das precipitações. *FI*: Fração insolúvel. *FS*: Fração solúvel. A seta indica a região do gel onde se observa a banda do monômero de AgB (8 kDa) e a cabeça de seta indica a região onde se observa a albumina do hospedeiro. (B) Purificação do AgB por cromatografia de imunoafinidade a partir da *FS* após precipitação com sulfato de amônio. A massa molecular dos multímeros visualizados está indicada à direita da imagem.

4.2 Composição de subunidades dos oligômeros do AgB

Amostras de AgB purificadas de líquido hidático de dois cistos (#360 e #348) foram analisadas quanto à composição de subunidades por espectrometria de massas. As proteínas purificadas em cada coluna de imunoafinidade foram analisadas separadamente. Primeiramente todas as frações foram digeridas em solução, no entanto, somente aquelas da amostra #360 produziram resultados. Nas três frações desta amostra identificou-se a subunidade AgB8/1, enquanto AgB8/4 foi identificado apenas na fração purificada com α -rAgB8/1. A subunidade

AgB8/2 foi identificada nas frações purificadas com α -rAgB8/2 e α -rAgB8/4 (Tabela 2.).

Tabela 2. Identificação das subunidades do AgB presentes nas frações purificadas por cromatografia de imunoafinidade a partir do líquido hidático #360.

| Amostra/fração | Subunidade | Peptídeo | Score |
|-------------------|------------|----------------------------------|-------|
| α -rAgB8/1 | AgB8/4 | K.YVKDLLEEEDEDDLK.- | 95 |
| | AgB8/1 | R.SVMKMFGEVK.Y + 2 Oxidation (M) | 53 |
| | | K.YFFERDPLGQK.V | 25 |
| α -rAgB8/2 | AgB8/1 | R.SVMKMFGEVK.Y + 2 Oxidation (M) | 36 |
| | AgB8/2 | R.NDPLGQR.L | 19 |
| α -rAgB8/4 | AgB8/1 | K.MFGEVK.Y + Oxidation (M) | 15 |
| | | K.ELEEVFQLLR.K | 47 |
| | | K.YFFERDPLGQK.V | 56 |
| | AgB8/2 | R.NDPLGQR.L | 17 |

Uma nova abordagem foi utilizada para a amostra #348, onde as três frações foram resolvidas em gel SDS-PAGE e após, as bandas correspondentes a diferentes multímeros (monômeros, dímeros e trímeros) foram excisadas e submetidas à digestão com tripsina. As subunidades AgB8/1 e AgB8/4 foram identificadas nas três frações da purificação dessa amostra. A subunidade AgB8/2 foi identificada apenas na fração purificada com anticorpo α -rAgB8/2 (Tabela 3).

Buscando verificar se havia alguma diferença de massa nos oligômeros purificados com cada anticorpo, as frações da amostra #348 foram analisadas em gel nativo. Não foi observado diferença entre as frações, todas apresentam uma banda predominante de aproximadamente 160 kDa, uma banda menos expressiva acima e um arraste, indicando a presença de oligômeros de alta massa molecular e variáveis em massa (Fig. 5).

Tabela 3. Identificação das subunidades do AgB presentes nas frações purificadas por cromatografia de imunoafinidade a partir do líquido hidático #348.

| Fração/banda | Subunidade | Peptídeos | Score | | |
|-------------------|------------|-----------------|------------------|------------------|----|
| α -rAgB8/1 | Monômero | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 43 | |
| | | AgB8/4 | K.DLLEEEDEDDLK.- | 17 | |
| | Dímero | AgB8/4 | R.KLGEIR.D | 30 | |
| | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 67 | |
| | Trímero | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 45 | |
| | | AgB8/4 | K.DLLEEEDEDDLK.- | 70 | |
| | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 41 | | |
| α -rAgB8/2 | Monômero | AgB8/1 | -.DDGLTSTSR.S | 35 | |
| | | | K.ELEEVFQLLR.K | 48 | |
| | | | K.YFFERDPLGQK.V | 59 | |
| | | AgB8/4 | R.KLGEIR.D | 16 | |
| | | | K.VHEVLKK.Y | 16 | |
| | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 52 | |
| | AgB8/2 | R.NDPLGQR.L | 17 | | |
| | Dímero | AgB8/4 | R.KLGEIR.D | 36 | |
| | | | K.VHEVLK.K | 18 | |
| | | | R.SDPLGQK.L | 19 | |
| | | | K.VHEVLKK.Y | 22 | |
| | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 74 | |
| | | | -.DDGLTSTSR.S | 18 | |
| | | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 53 | |
| | | | AgB8/2 | R.NDPLGQR.L | 22 |
| | | Trímero | AgB8/4 | R.KLGEIR.D | 30 |
| | | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 78 |
| | | | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 40 |
| α -rAgB8/4 | | Monômero | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 51 |
| | AgB8/4 | | K.YFFERDPLGQK.V | 55 | |
| | Dímero | AgB8/4 | K.DLLEEEDEDDLK.- | 44 | |
| | | | R.KLGEIR.D | 26 | |
| | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 92 | |
| | Trímero | AgB8/1 | K.ELEEVFQLLR.K | 56 | |
| | | AgB8/4 | R.KLGEIR.D | 48 | |
| | | | K.DLLEEEDEDDLK.- | 96 | |
| | | AgB8/1 | K.YFFER.D | 15 | |
| | | | K.ELEEVFQLLR.K | 48 | |
| | | K.YFFERDPLGQK.V | 22 | | |

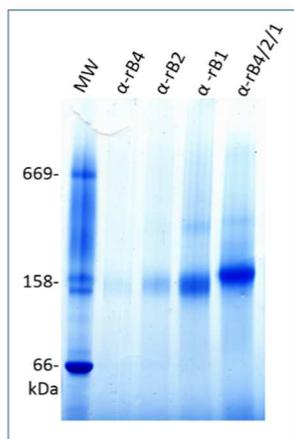


Figura 5. Gel nativo BN-PAGE para o AgB #348 de *E. granulosus*. 10 µg das amostras purificadas com os anticorpos α -rAgB8/1, α -rAgB8/2 e α -rAgB8/4 separadamente e reunidas, conforme indicado no topo da imagem, foram resolvidas em gel Bis-Tris/Tricina 4-16% do tipo *Blue Native* (BN). *MW*: as proteínas utilizadas como marcadores de massa molecular foram tiroglobulina bovina (669 kDa), gama globulina bovina (158 kDa) e albumina bovina (66 kDa).

4.3 Efeito do AgB sobre células de mamíferos em cultura

Células A549, RH, NIH/3T3 e J774 foram tratadas com AgB por 24 h e, em seguida, a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de MTT. O MTT é um sal tetrazólio solúvel, de cor amarela, que é convertido por células metabolicamente ativas em formazan, um produto insolúvel de cor azul/púrpura (RISS *et al.*, 2013). Assim, a quantidade de formazan gerada é proporcional ao número de células metabolicamente ativas/viáveis.

As células foram tratadas com concentrações crescentes de AgB dentro do intervalo de 1-100 µg/ml e os resultados representam a média de 4 experimentos independentes, cada qual realizado com proteína purificada de cistos diferentes. A linhagem A549 apresentou a maior sensibilidade ao tratamento, com diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle, para as concentrações a partir de 5 µg/ml. A taxa de metabolização do MTT, variou de 57% para a concentração mais alta (100 µg/ml) de AgB até 73% para a concentração mais baixa (1 µg/ml). A segunda linhagem mais sensível foi a RH, cuja taxa de conversão de MTT variou de 68% em 100 µg/ml de proteína até 86% em 1 µg/ml.

Entretanto, somente foi observada diferença estatística para concentrações a partir de 25 µg/ml. As linhagens NIH/3T3 e J774 apresentaram sensibilidade similar ao tratamento com AgB, porém não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Os níveis de conversão do MTT, na concentração mais alta, foram de 80% e 78% para NIH/3T3 e J774, respectivamente (Fig. 6). O efeito parece ser dose independente, pois não foi observada diferença estatística entre os tratamentos com diferentes concentrações de AgB.

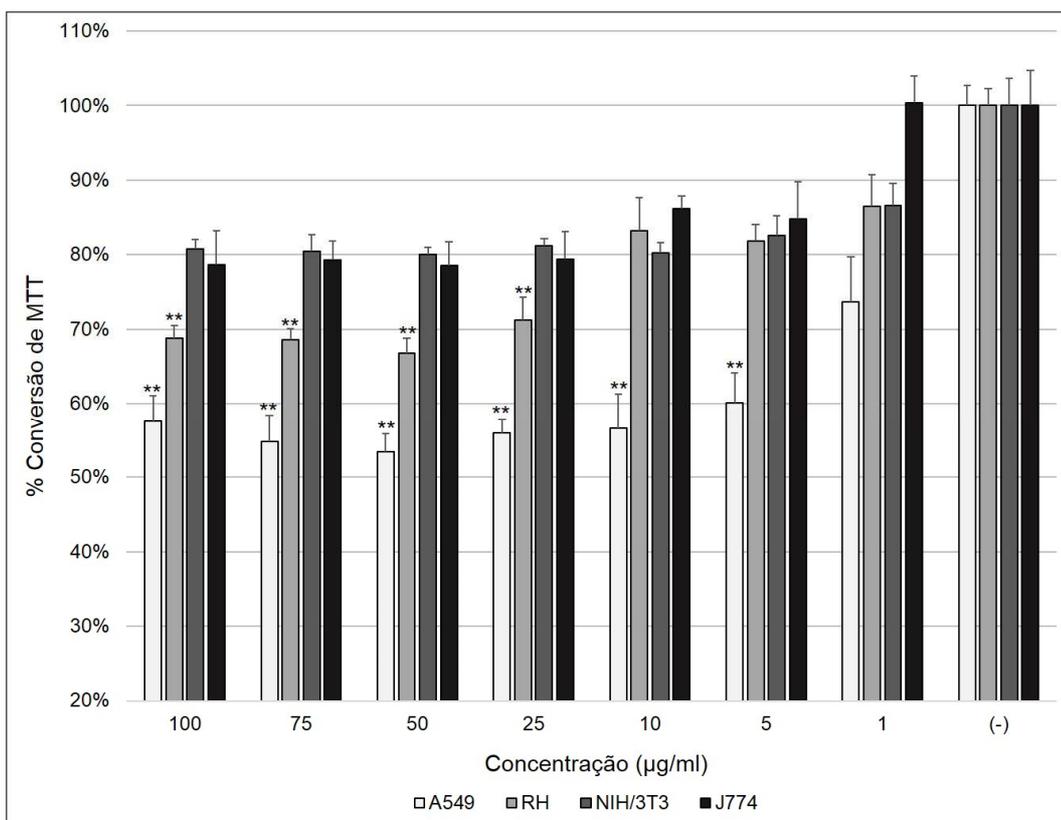


Figura 6. Capacidade de conversão de MTT de células em cultura após 24 h de incubação com diferentes concentrações de AgB. Células das linhagens NIH/3T3, A549, RH e J774 foram expostas ao AgB de *E. granulosus* nas concentrações indicadas no eixo x. Resultados apresentados como porcentagem em relação ao controle tratado apenas com tampão e considerado 100%. Os valores representam média e desvio padrão de quatro experimentos independentes conduzidos em triplicata. ** $P < 0,01$ em relação ao controle.

Devido a sua maior sensibilidade no ensaio de MTT, a linhagem A549 foi utilizada para contagem do número de células em hemocítmetro e cálculo do número de duplicações celulares após tratamento com 25 µg/ml de proteína por 24, 48 e 72 h. Para os três tempos analisados, foi observado um menor número de células na cultura tratada (Fig. 7), no entanto, somente em 48h essa redução foi estatisticamente significativa. O número de células foi 29% menor após 48h de tratamento com AgB, em relação ao controle (inserto da Fig. 7).

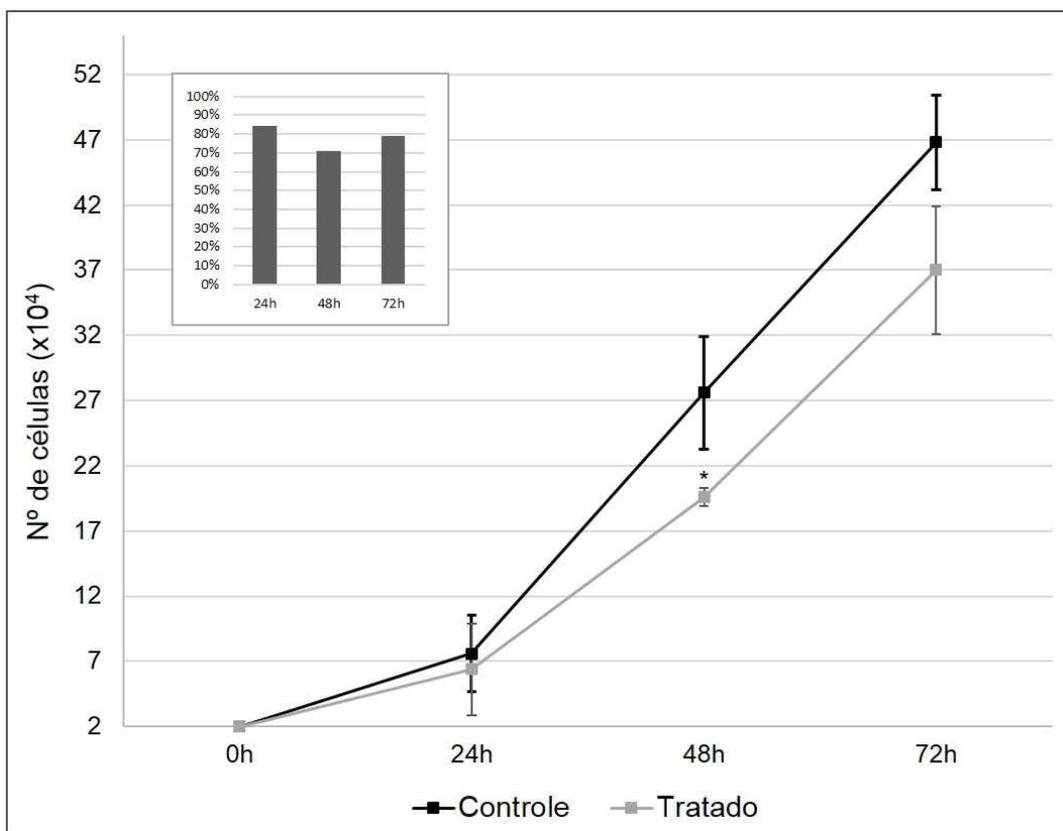


Figura 7. Efeito do AgB sobre o número de células A549 após diferentes tempos de tratamento. Células da linhagem A549 foram contadas em hemocítmetro após exposição a 25 µg/ml de AgB, nos tempos indicados no eixo x. As células do grupo controle foram tratadas apenas com tampão. O gráfico apresenta o número absoluto de células determinado após os três tempos de tratamento, sendo o tempo 0 = 2x10⁴ células. Os valores representam a média ± desvio padrão de três contagens. *P<0,05 em relação ao respectivo controle. No gráfico inserto os dados são apresentados como proporção relativa ao controle tratado apenas com tampão e considerado 100%.

O cálculo do número de duplicações mostrou que, em 24 e 48 h a cultura tratada com AgB apresenta um número menor de duplicações em relação ao controle, entretanto, em 72 h ocorre uma inversão e o número de duplicações é

maior na cultura tratada (Fig. 8). Todavia, tanto as diferenças entre os grupos tratado e controle quanto entre os diferentes tempos não se mostraram significativas.

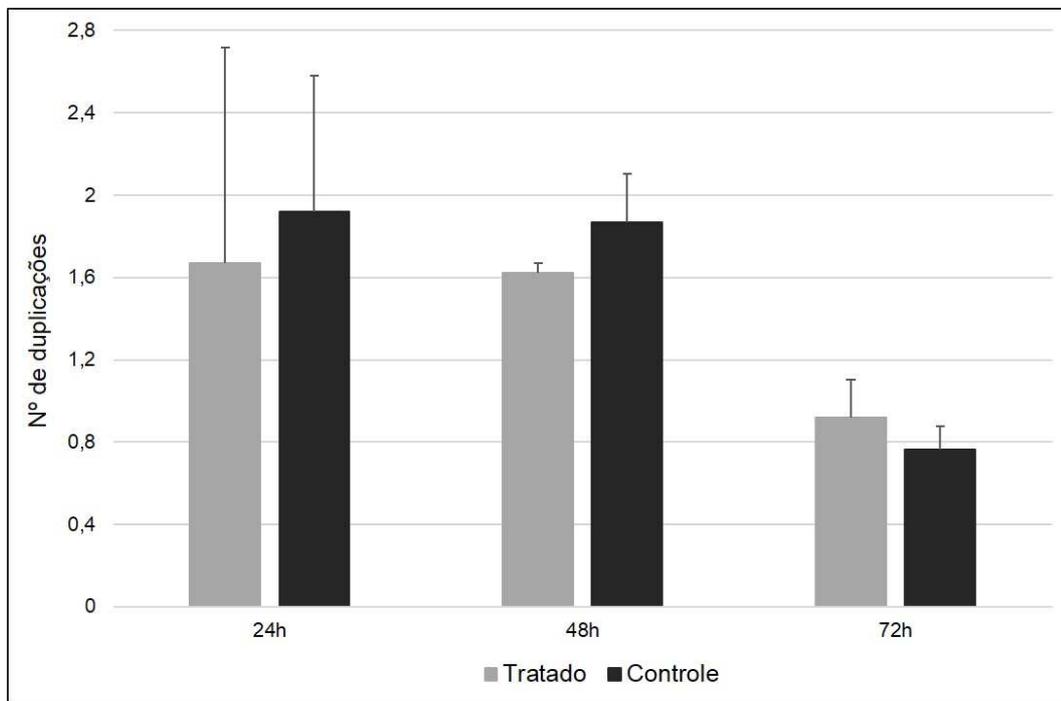


Figura 8. Número de duplicações da população de células A549 tratadas com 25 µg/ml de AgB. Células da linhagem A549 foram contadas em hemocitômetro após 24, 48 e 72 h de incubação com AgB. O número de duplicações foi calculado conforme descrito por Lorge *et al.*(2008). Os dados representam a média e desvio padrão de três contagens.

4.4 O AgB é internalizado por diferentes linhagens celulares

Células A549, RH, NIH/3T3 e J774 foram incubadas com 25 µg/ml de AgB por 4 h e em seguida foram fixadas e preparadas para análise por microscopia confocal. Para todas as linhagens foi observada a presença do AgB no compartimento citoplasmático, indicando que o AgB interage com as diferentes linhagens celulares e é internalizado pelas mesmas (Fig. 9).

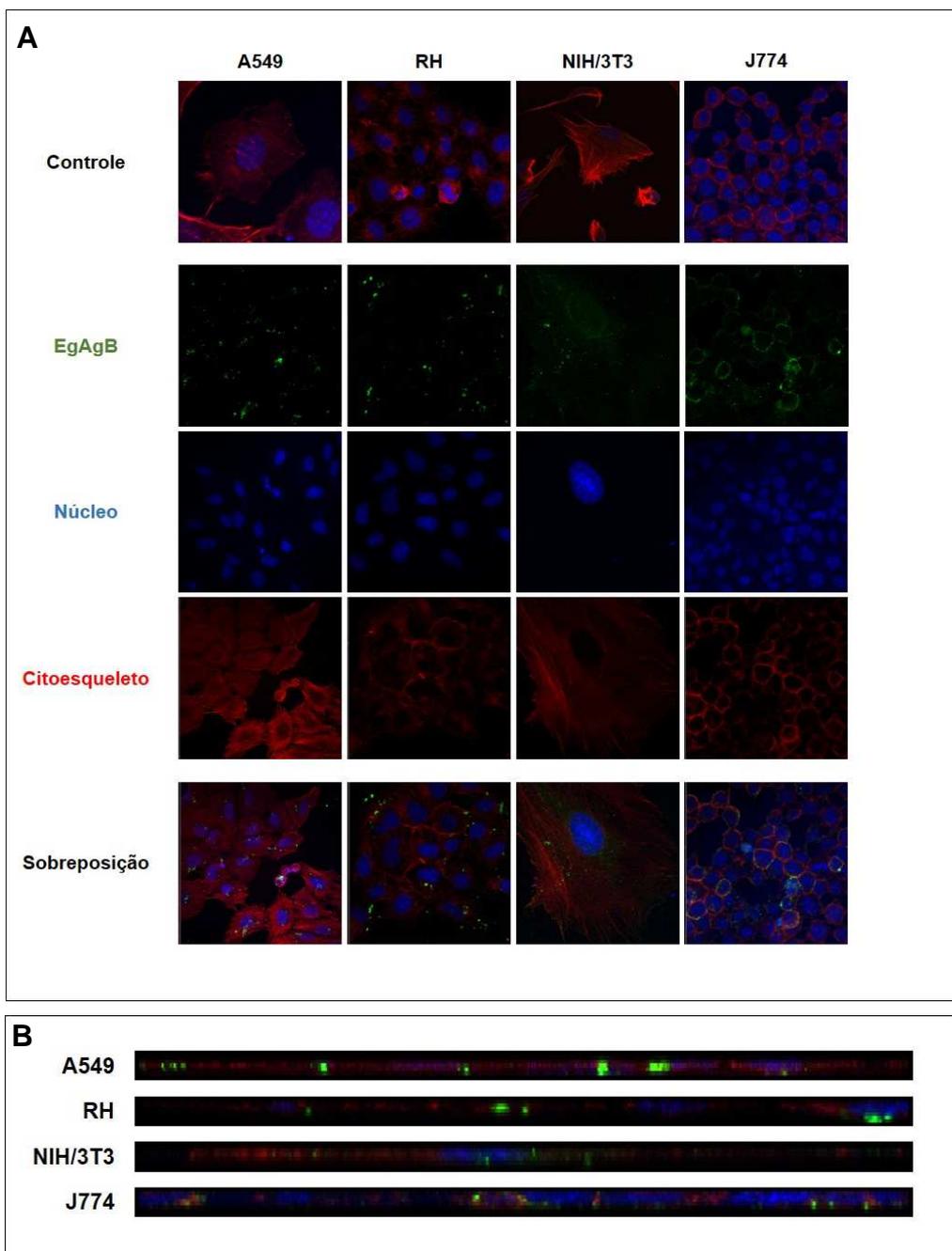


Figura 9. Oligômeros do AgB são internalizados por células de mamíferos em cultura. As células foram cultivadas em presença de AgB por 4 h e fixadas em paraformaldeído. A marcação imunofluorescente foi feita com um *pool* de anticorpos primários α -AgB8/1-2-4 e secundário α -IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 488. (A) Secções medianas de séries Z obtidas por microscopia confocal mostrando a localização citoplasmática da proteína internalizada (verde). Em azul, DAPI (núcleo) e em vermelho, faloidina conjugada à Alexa Fluor® 594 (actina). Controle representa células tratadas apenas com tampão. (B) Projeção ortogonal (plano vertical em relação à série Z) confirmando a localização interna do AgB.

4.4.1 Mecanismos de endocitose estão envolvidos na internalização do AgB

A internalização por endocitose é inibida em baixas temperaturas (RICHARD *et al.*, 2003; NISHI; SAIGO, 2007), assim, com o objetivo de verificar se o AgB tem acesso ao citoplasma celular por algum processo de endocitose, células da linhagem RH foram incubadas com AgB nas condições de tempo e concentração de proteína descritas anteriormente, porém, a temperatura de incubação foi alterada para 4°C. Como podemos observar na figura 10, o AgB não foi detectado no citoplasma das células nessas condições.

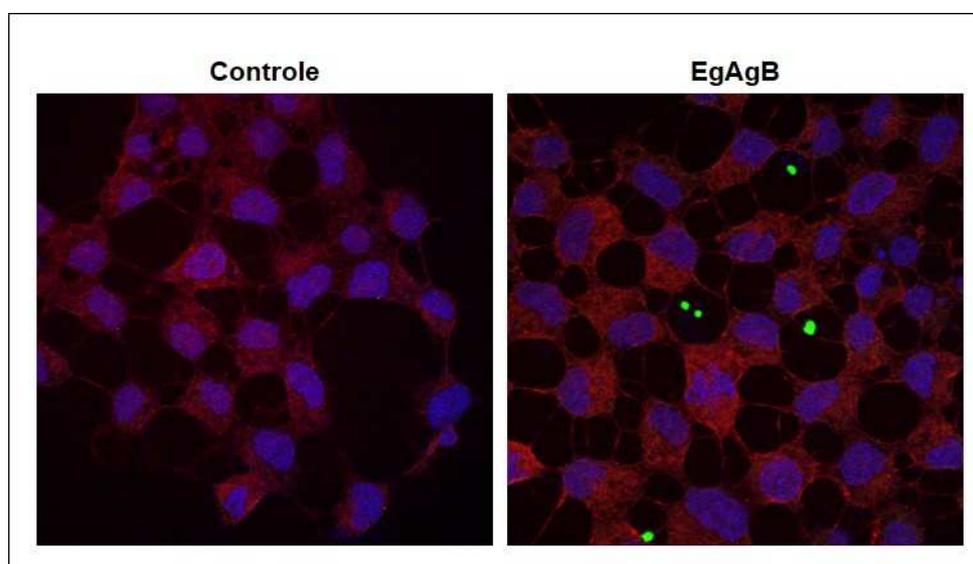


Figura 10. Inibição da internalização do AgB em baixas temperaturas. Células RH foram cultivadas a 4°C, na presença de AgB, por 4 h e fixadas em paraformaldeído. A marcação imunofluorescente foi feita com anticorpo primário α -AgB8/1-2-4 e secundário conjugado a Alexa Fluor® 488 (verde). Em azul, DAPI (núcleo) e em vermelho, faloidina conjugada à Alexa Fluor® 594 (actina). Controle representa células tratadas apenas com tampão.

5 DISCUSSÃO

O *E. granulosus* é um helminto de vida longa que possui diversos mecanismos moleculares que viabilizam seu desenvolvimento e o protegem da eliminação, ao mesmo tempo em que minimiza a patologia no hospedeiro. Para evadir-se da resposta imune do hospedeiro, assim como para obter os nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, o parasito secreta e expõe diferentes moléculas (SIRACUSANO *et al.*, 2008b).

O AgB é o principal antígeno presente no líquido hidático de *E. granulosus*. Embora sua função biológica não seja totalmente compreendida, duas principais funções são atribuídas ao AgB: imunomodulação e captura e transporte de moléculas lipídicas do hospedeiro (CHEMALE *et al.*, 2005; SIRACUSANO *et al.*, 2008b, 2012b; OBAL *et al.*, 2012). Este trabalho buscou avaliar a interação do AgB com diferentes tipos celulares e os efeitos dessa interação, produzindo informação sobre os mecanismos moleculares pelos quais o AgB exerce suas funções e contribuindo para uma melhor compreensão da função biológica dessa proteína.

A contribuição de cada subunidade para a função e/ou estrutura do AgB nativo ainda é desconhecida. Em relação à função, sabe-se que as subunidades recombinantes AgB8/1 e AgB8/2 são capazes de ligar compostos hidrofóbicos de maneira similar a proteína nativa (CHEMALE *et al.*, 2005). Em relação à estrutura, está descrito que as subunidades recombinantes AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/3 são capazes de se associar de forma não-covalente, formando oligômeros com características similares aos oligômeros nativos (MONTEIRO *et al.*, 2007, 2012). Além disso, as informações disponíveis sobre a expressão de cada subunidade são contrastantes, demonstrando que existe variação na expressão das subunidades do AgB entre cistos de *E. granulosus*. Monteiro *et al.* (2012) encontraram em líquido hidático, tanto de cisto bovino quanto de cisto humano, as subunidades AgB8/1, AgB8/2, AgB8/3 e AgB8/4, sendo a subunidade AgB8/1 a mais representada e a AgB8/3 com os níveis mais baixos. Em outra análise proteômica, Aziz *et al.* (2011) identificaram as subunidades AgB8/1, AgB8/3 e

AgB8/4 em líquido hidático bovino e AgB8/1 e AgB8/4 em líquido hidático humano.

Este trabalho avaliou o conteúdo de subunidades em amostras de AgB purificado com diferentes anticorpos com o objetivo de verificar se essa metodologia seria capaz de separar frações de oligômeros com variação na composição de subunidades. Os resultados mostraram que nos dois líquidos hidáticos estavam presentes as subunidades AgB8/1, AgB8/2 e AgB8/4. Entretanto, a subunidade AgB8/1 foi a única identificada em todas as análises, independente do anticorpo utilizado para a purificação. Por outro lado, para ambas amostras de líquido hidático, a subunidade AgB8/2 não foi identificada na fração purificada com α -rAgB8/1.

As diferenças qualitativas observadas entre as frações purificadas com diferentes anticorpos poderiam ser decorrentes de variações na composição de subunidades dos oligômeros de um mesmo cisto, o que pode ter implicações nas funções desempenhadas por essa proteína. Alguns oligômeros poderiam estar mais voltados ao transporte de lipídios, enquanto outros estariam associados à modulação da resposta imune. Além disso, as diferenças observadas neste trabalho em relação à literatura mencionada anteriormente ressaltam as variações na expressão dos genes do AgB em diferentes indivíduos.

Uma hipótese para essa variabilidade entre indivíduos é a expressão de diferentes subunidades como adaptação ao indivíduo hospedeiro, regulando a função da proteína de acordo com as necessidades do parasito. Outra possibilidade é que a variabilidade esteja correlacionada com a idade do metacestódeo. A coleta dos cistos hidáticos diretamente dos seus hospedeiros intermediários naturais tem a vantagem de fornecer material de estudo em uma condição nativa. Mas por outro lado, não possibilita saber o tempo de infecção, informação esta que permitiria analisar possíveis variações de expressão ao longo do desenvolvimento do metacestódeo.

O AgB teve efeito sobre a atividade metabólica das quatro linhagens celulares avaliadas, conforme demonstrado pelos ensaios de MTT. A taxa de conversão do MTT foi menor nas culturas tratadas, porém em níveis variados dependendo do tipo celular. O efeito do AgB foi significativo somente em células

epiteliais de pulmão (A549) em concentrações acima de 5 µg/ml e hepatócitos (RH) acima de 25 µg/ml. Pulmões e fígado são os principais órgãos afetados pela hidatidose cística (THOMPSON, 1995). A maior sensibilidade desses tipos celulares pode refletir uma adaptação do metacestódeo em se estabelecer e se desenvolver, preferencialmente, nesses órgãos.

Embora seja amplamente utilizado, o ensaio de MTT não permite inferir especificamente qual o efeito da proteína sobre as células. Trata-se de um indicador de estresse fisiológico, que, por sua vez, pode levar à morte celular, redução da proliferação ou alterações no metabolismo, reflexo da menor taxa de conversão do MTT (RISS *et al.*, 2013).

A variação na quantidade de células após o tratamento com AgB foi verificada para a linhagem A549. Após incubação com AgB por 24, 48 e 72 h as células foram imediatamente contadas em hemocitômetro. Observou-se um número de células menor na cultura tratada, o que seria indicativo de que mecanismos de morte celular e/ou redução da proliferação podem estar ocorrendo. Contudo, apenas após 48 h a redução foi significativa, esse resultado não era esperado, visto que os efeitos no ensaio de MTT são observados em 24 h. Uma explicação para esse contraste seria que os efeitos do AgB são diferentes ao longo do tempo. Neste cenário, em um primeiro momento os efeitos seriam mais pronunciados sobre o estado fisiológico da célula e, em um segundo momento, levariam à redução de proliferação ou morte celular.

Após a contagem em hemocitômetro foi calculado o número de duplicações celulares e não foi observada diferença estatística entre os grupos tratado e controle para este parâmetro. Mesmo assim, é interessante ressaltar que o número de duplicações é maior no controle até as 48 h. Em 72 h, esse número é maior na cultura tratada. Essa inversão em 72 h poderia resultar da proliferação das células que sobreviveram e permaneceram viáveis nas primeiras 48 h de tratamento. Além disso, a menor confluência nesse grupo pode ter favorecido sua proliferação após as 48 h. Seria interessante refazer o experimento de contagem de células após o tratamento com AgB e cálculo do número de duplicações com um número de amostras maior, visto que o teste estatístico pode não ter apontado

diferenças devido ao baixo n amostral utilizado ($n=3$) e à alta variação experimental.

O AgB interage diretamente com as células *in vitro*, pois como observado por imunofluorescência, todas as linhagens analisadas foram capazes de internalizar a proteína. A internalização do AgB parece ser dependente de vias de endocitose, pois não ocorre em baixa temperatura (4°C), condição esta que reduz a atividade celular bloqueando as vias de endocitose (RICHARD *et al.*, 2003; NISHI; SAIGO, 2007).

A alta massa molecular não deve ser um empecilho para a internalização dos oligômeros de AgB, visto que diversas proteínas oligoméricas, de diferentes organismos, são descritas na literatura sendo internalizadas por células em cultura. A proteína HypF-N de *Escherichia coli* é uma proteína amiloidogênica não patogênica cujos oligômeros são descritos como sendo capazes de penetrar no citoplasma de células em cultura e causar citotoxicidade (BUCCIANINI *et al.*, 2002; CAMPIONI *et al.*, 2010; ZAMPAGNI *et al.*, 2011). Mesmo as proteínas associadas à doenças de deposição, α -sinucleína (Doença de Parkinson) e huntingtina (Doença de Huntington) por exemplo, formam oligômeros e agregados de alta massa molecular que não só são internalizados como também são transferidos de uma célula para outra (YANG *et al.*, 2002; REN *et al.*, 2009; DANZER *et al.*, 2011, 2012).

Folle *et al.* (2013) descrevem que o AgB liga à monócitos/macrófagos e esta interação é inibida na presença de LDL, sugerindo que AgB e LDL poderiam compartilhar um mesmo receptor. O receptor LDLR (*Low-density-lipoprotein receptor*) foi testado, mas parece não estar envolvido na interação de monócitos/macrófagos com AgB (FOLLE *et al.*, 2013).

A endocitose também pode ocorrer independentemente de receptor proteico, algumas proteínas ligam a lipídios específicos de membrana utilizando-os como via de entrada na célula (EWERS; HELENIUS, 2011). Nesses casos, a internalização ocorre por mecanismos de endocitose não usuais, como *rafts* lipídicas e indução de curvatura na membrana (EWERS; HELENIUS, 2011). Considerando a alta afinidade do AgB por lipídios, esse também pode ser um mecanismo para sua entrada nas células. De qualquer forma, estudos mais

específicos são necessários para determinar a via de entrada do AgB em células em cultura.

A interação do AgB com as células de mamíferos é relevante no contexto da hidatidose cística, especialmente em relação a sua função como molécula carreadora de lipídios. O AgB pertence ao grupo das HLBP, proteínas exclusivas de cestódeos com um papel biológico central no sequestro e distribuição de lipídios do hospedeiro para o parasito (ALVITE; ESTEVES, 2012). Em cestódeos, enzimas chave para síntese *de novo* de colesterol e ácidos graxos estão ausentes, por isso, o parasito busca essas moléculas no hospedeiro empregando proteínas transportadoras, FABPs (*Fatty-acid binding protein*) e o AgB (TSAI *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013).

Os resultados dos ensaios de MTT e da imunofluorescência sugerem que a internalização pelas células poderia fazer parte do mecanismo pelo qual o AgB tem acesso aos lipídios de que o parasito necessita e, durante esse processo, causar algum estresse fisiológico para a célula, levando a alterações metabólicas e, até mesmo, redução da viabilidade celular.

Oligômeros de proteínas como a HypF-N causam influxo de Ca^{2+} nas células em cultura, o metabolismo oxidativo requerido para rearmazenar o Ca^{2+} livre leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez podem causar danos à célula (ZAMPAGNI *et al.*, 2011). Acredita-se que a exposição e flexibilidade de resíduos hidrofóbicos na superfície dos oligômeros esteja relacionada à capacidade dessa proteína de causar disfunções nas células (ZAMPAGNI *et al.*, 2011). Alterações no gradiente de íons através da membrana também são causadas pela α -sinucleína e são resultado da interação dos oligômeros solúveis com membranas (MEREDITH, 2005). A α -sinucleína é uma molécula anfifílica e as regiões hidrofóbicas parecem ser importantes para a interação ao possibilitar a inserção dos oligômeros nas membranas, levando a uma desestabilização local ou à formação de poros não seletivos (VOLLES *et al.*, 2001; MEREDITH, 2005).

Embora as proteínas oligoméricas citadas tenham efeitos citotóxicos já bem conhecidos e até mesmo mais pronunciados do que o AgB, é possível que existam semelhanças no mecanismo, porém, com diferenças na intensidade.

Modelos computacionais baseados na sequência de aminoácidos de três subunidades do AgB (AgB8/1-2-3) demonstram que tratam-se de moléculas anfifílicas, com uma face hidrofílica e outra hidrofóbica (MONTEIRO *et al.*, 2007). Assim como nas outras proteínas oligoméricas mencionadas, essa característica pode ser importante no processo de interação proteína-célula e, adicionalmente, causar efeitos adversos para as células do tecido hospedeiro. Estudos mais específicos são necessários para determinar que mudanças o AgB provoca nas células e se os seus efeitos podem ser considerados citotóxicos.

Neste trabalho foi demonstrado que o AgB é internalizado por células de mamíferos em cultura e é capaz de alterar o estado fisiológico das mesmas, sugerindo que interações diretas entre o AgB e as células do hospedeiro podem ocorrer durante os processos de imunomodulação e sequestro de lipídios desempenhados pelo AgB. Associados a estes processos, também podem ocorrer alterações fisiológicas nas células dos tecidos hospedeiros importantes para o crescimento e sobrevivência do metacésteo.

6 PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas deste trabalho estão determinar as vias de endocitose que possam estar envolvidas na internalização do AgB, utilizando inibidores conhecidos para diferentes vias de endocitose, e avaliar se ocorre indução de mecanismos de morte celular resultante da ação do AgB sobre as células em cultura por meio de citometria de fluxo. Além disso, também é uma perspectiva analisar o conteúdo de microvesículas produzidas por células expostas ao AgB *in vitro*, com o objetivo de i) verificar se poderia ser utilizada pelo AgB como rota de saída das células, no contexto do sequestro e transporte de lipídios; e ii) analisar se os efeitos do AgB se estendem à alterações na comunicação célula-célula.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ ROJAS, C. A; ROMIG, T.; LIGHTOWLERS, M. W. *Echinococcus granulosus* sensu lato genotypes infecting humans - review of current knowledge. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 9–18, jan. 2014.
- ALVITE, G.; ESTEVES, A. Lipid binding proteins from parasitic platyhelminthes. **Frontiers in Physiology**, v. 3, n. September, p. 363, jan. 2012.
- AREND, A C. *et al.* The *Echinococcus granulosus* antigen B shows a high degree of genetic variability. **Experimental Parasitology**, v. 108, n. 1-2, p. 76–80, 2004.
- AZIZ, A. *et al.* Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1560–72, 24 ago. 2011.
- BALBINOTTI, H. *et al.* *Echinococcus ortleppi* (G5) and *Echinococcus granulosus* sensu stricto (G1) loads in cattle from Southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 255–60, 10 set. 2012.
- BARNES, T. S. *et al.* Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. **Acta Tropica**, v. 123, n. 1, p. 1–7, jul. 2012.
- BARRETT, J. *et al.* Characterisation and properties of an intracellular lipid-binding protein from the tapeworm *Moniezia expansa*. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 250, n. 2, p. 269–75, 1 dez. 1997.
- BUCCIANTINI, M. *et al.* Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 507–11, 4 abr. 2002.
- BUDKE, C. M.; DEPLAZES, P.; TORGERSON, P. R. Global Socioeconomic Impact of Cystic Echinococcosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 296–303, 2006.
- CAMERON, T; WEBSTER, G. The histogenesis of the hydatid cyst (*Echinococcus* spp.). I. Liver cysts in large mammals. **Canadian Journal of Zoology**, v. 47, n. 6, p. 1405-1410, nov 1969.
- CAMPIONI, S. *et al.* A causative link between the structure of aberrant protein oligomers and their toxicity. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 140–7, fev. 2010.
- CARDONA, G. A; CARMENA, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 10–32, 18 fev. 2013.

- CARMENA, D.; BENITO, A.; ERASO, E. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection: An update. **Acta Tropica**, v. 98, n. 1, p. 74–86, abr. 2006.
- CHEMALE, G. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B is encoded by a gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 233–7, 3 set. 2001.
- CHEMALE, G. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B hydrophobic ligand binding properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1747, n. 2, p. 189–94, 14 mar. 2005.
- D’ALESSANDRO, A.; RAUSCH, R. L. New aspects of neotropical polycystic (*Echinococcus vogeli*) and unicystic (*Echinococcus oligarthrus*) echinococcosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 380–401, abr. 2008.
- DANZER, K. M. *et al.* Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular α -synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. **FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 326–36, jan. 2011.
- DANZER, K. M. *et al.* Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. **Molecular Neurodegeneration**, v. 7, n. 1, p. 42, jan. 2012.
- DAVIES, C. *et al.* Ultrastructural immunocytochemical localization of two hydatid fluid antigens (antigen 5 and antigen B) in the brood capsules and protoscoleces of ovine and equine *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. **Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 143–52, 1978.
- DE LA RUE, M. L. *et al.* New data on *Echinococcus* spp . in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 2, p. 103–104, 2006.
- DE LA RUE, M. L. Cystic echinococcosis in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 53–6, 2008.
- ECKERT, J.; DEPLAZES, P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 1, p. 107–135, 2004.
- EWERS, H.; HELENIUS, A. Lipid-mediated endocytosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 8, p. a004721, ago. 2011.
- FARIAS, L. N. *et al.* Echinococcosis in southern Brazil: efforts toward implementation of a control program in Santana do Livramento, Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 3, p. 153–6, 2004.

FERNÁNDEZ, V. *et al.* Molecular characterisation of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 77, n. 2, p. 247–50, maio 1996.

FOLLE *et al.* Structural and functional characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B. In: International Conference in Lipid Binding Proteins, 8., 2013, La Plata. **Conference Program and Abstracts**. La Plata, 2013. p. 46.

FROSCH, P. *et al.* Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 64, n. 1, p. 171–5, mar. 1994.

GONZÁLEZ-SAPIENZA, G.; LORENZO, C.; NIETO, A. Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 3979–83, nov. 2000.

KERN, P. *Echinococcus granulosus* infection: clinical presentation, medical treatment and outcome. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 388, n. 6, p. 413–20, dez. 2003.

LEE, E.G. *et al.* A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis. **Proteomics**, v. 7, n. 21, p. 4016–30, nov. 2007.

LIGHTOWLERS, M. *et al.* Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 171–82, 1989.

LORGE, E. *et al.* Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test. I. Theoretical aspects. **Mutation Research**, v. 655, n. 1-2, p. 1–3, 2008.

MAMUTI, W. *et al.* Molecular characterization of a novel gene encoding an 8-kDa subunit of antigen B from *Echinococcus granulosus* genotypes 1 and 6. **Parasitology International**, v. 56, n. 4, p. 313–6, dez. 2007.

MCMANUS, D. P. *et al.* Echinococcosis. **Lancet**, v. 362, n. 9392, p. 1295–304, 18 out. 2003.

MEREDITH, S. C. Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, p. 181–221, dez. 2005.

MONTEIRO, K. M. *et al.* Self-assembly and structural characterization of *Echinococcus granulosus* antigen B recombinant subunit oligomers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1774, n. 2, p. 278–85, fev. 2007.

MONTEIRO, K. M. *et al.* Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1985–99, maio 2010.

MONTEIRO, K. M. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B structure: subunit composition and oligomeric states. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1551, jan. 2012.

MORO, P.; SCHANTZ, P. M. Echinococcosis: a review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 125–33, mar. 2009.

MUSIANI, P. *et al.* *Echinococcus granulosus*: specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 5, p. 475–8, maio 1978.

MUZULIN, P. M. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B gene family: further studies of strain polymorphism at the genomic and transcriptional levels. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 156–64, fev. 2008.

NAKAO, M. *et al.* A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. **Parasitology**, v. 134, n. 5, p. 713–22, maio 2007.

NAKAO, M. *et al.* Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). **International Journal for Parasitology**, v. 43, n. 12-13, p. 1017–29, nov. 2013.

NISHI, K.; SAIGO, K. Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27503–17, 14 set. 2007.

OBAL, G. *et al.* Characterisation of the native lipid moiety of *Echinococcus granulosus* antigen B. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1642, jan. 2012.

OLSON, P. D. *et al.* Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 2-3, p. 130–50, 2012.

ORIOLO, C.; ORIOLO, R. Physiocochemical properties of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 24, n. 1, p. 96–100, 1975.

ORIOLO, R. *et al.* Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 20, n. 4, p. 569–74, 1971.

REN, P. *et al.* Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 219–225, 2009.

RICHARD, J. P. *et al.* Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 1, p. 585–90, 3 jan. 2003.

RIGANÒ, R. *et al.* Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 288–296, 2001.

RIGANÒ, R. *et al.* *Echinococcus granulosus*-specific T-cell lines derived from patients at various clinical stages of cystic echinococcosis. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 1, p. 45–52, jan. 2004.

RIGANÒ, R. *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1667–78, abr. 2007.

RISS, T. *et al.* Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. *et al.* (Eds.). **Assay Guidance Manual**. Internet ed. [s.l.] Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.

ROTT, M. B. *et al.* Comparative analysis of two different subunits of antigen B from *Echinococcus granulosus*: gene sequences, expression in *Escherichia coli* and serological evaluation. **Acta Tropica**, v. 75, n. 3, p. 331–40, 31 maio 2000.

SAARMA, U. *et al.* A novel phylogeny for the genus *Echinococcus*, based on nuclear data, challenges relationships based on mitochondrial evidence. **Parasitology**, v. 136, n. 3, p. 317–28, mar. 2009.

SÁNCHEZ, F. *et al.* Immunochemical localization of major hydatid fluid antigens in protoscoleces and cysts of *Echinococcus granulosus* from human origin. **Parasite Immunology**, v. 13, n. 6, p. 583–92, 1991.

SANTOS, D.V. *et al.* Análise das principais lesões encontradas nos abatedouros registrados na CISPOA. **Informativo técnico DPA/SEAPA**, Porto Alegre, n.4, ano 1, jul 2010.

SANTOS, G. B. *et al.* Mitochondrial and nuclear sequence polymorphisms reveal geographic structuring in Amazonian populations of *Echinococcus vogeli* (Cestoda: Taeniidae). **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 13-14, p. 1115–8, dez. 2012.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Analytical Biochemistry**, v. 199, n. 2, p. 223–31, 1991.

SHEPHERD, J. C.; AITKEN, A.; MCMANUS, D. P. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 81–90, jan. 1991.

SILVA *et al.* *Echinococcus granulosus* antigen B: A novel antiinflammatory lipoprotein at the host-parasite interface. In: International Conference in Lipid Binding Proteins, 8., 2013, La Plata. **Conference Program and Abstracts**. La Plata, 2013. p. 26.

SIRACUSANO, A. *et al.* Critical points in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis in humans. **Parassitologia**, v. 46, n. 4, p. 401–3, 2004.

SIRACUSANO, A. *et al.* Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 483–489, 2008a.

SIRACUSANO, A. *et al.* Molecular cross-talk in host-parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. **International Journal for Parasitology**, v. 38, n. 12, p. 1371–6, out. 2008b.

SIRACUSANO, A. *et al.* Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 639362, jan. 2012a.

SIRACUSANO, A. *et al.* Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 16–23, mar. 2012b.

THOMPSON, R. C. A. Biology and systematics of *Echinococcus*. In: THOMPSON, R. C. A.; LAMBERY, A. (Eds.). ***Echinococcus and hydatid disease***. Wallingford: CAB International, 1995. p. 1–50.

TORGERSON, P.R.; CRAIG, P. Updated global burden of cystic and alveolar echinococcosis. In: **Report of the WHO Informal Working Group on cystic and alveolar echinococcosis surveillance, prevention and control, with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Organisation for Animal Health**. WHO/OIE. Geneva, 2011. p.1.

TSAI, I. J. *et al.* The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. **Nature**, v. 496, n. 7443, p. 57–63, 4 abr. 2013.

VIRGINIO, V. G. *et al.* A set of recombinant antigens from *Echinococcus granulosus* with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 132, n. 2, p. 309–15, maio 2003.

VIRGINIO, V. G. *et al.* Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 935–42, abr. 2007.

VIRGINIO, V. G. *et al.* Excretory/secretory products from in vitro-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 1, p. 15–22, maio 2012.

VOLLES, M. J. *et al.* Vesicle Permeabilization by Protofibrillar R -Synuclein : Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson ' s Disease. **Biochemistry**, v. 40, n. 26, p. 7812–7819, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Echinococcosis. In: **First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, 2010. p.107-112.

YANG, W. *et al.* Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 23, p. 2905–2917, 2002.

ZAMPAGNI, M. *et al.* A comparison of the biochemical modifications caused by toxic and non-toxic protein oligomers in cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 10, p. 2106–2116, 2011.

ZHANG, W. *et al.* Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. **Clinical & Developmental Immunology**, jan. 2012.

ZHANG, W.; LI, J.; MCMANUS, D. P. Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, 2003.

ZHENG, H. *et al.* The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1168–75, out. 2013.

ANEXO I – CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

DA SILVA, E.D.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Edileuza Danieli da Silva

Local e data de nascimento: Capitão Leônidas Marques, PR, Brasil - 17/09/1986

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia

Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421 salas 204 e 206

Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos

Agronomia - Porto Alegre

91501-970, RS - Brasil

Telefone profissional: 51 33086070

E-mail: edidanieli@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

2006 - 2011 Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: A afetividade na sala de aula

Orientador: Prof. Dra Russel Teresinha Dutra da Rosa

2012 - 2014 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Título: Avaliação dos efeitos do antígeno B de *Echinococcus granulosus* sobre células de mamíferos em cultura

Orientador: Prof. Dr Arnaldo Zaha

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2.1 Formação complementar

Janeiro/2009 Extensão universitária em Bioinformática no Desenvolvimento de Vacinas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

3. ESTÁGIOS:

2007/1º sem. Bolsista de Iniciação Científica voluntário

Vínculo: Graduação

Instituição de realização: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Projeto: Estudo da expressão de catepsinas L nos diferentes estágios do ciclo de vida de *Fasciola hepatica* e sua importância no processo de invasão.

Orientador: Prof. Dr Arnaldo Zaha

2007 - 2011 Bolsista de Iniciação Científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Vínculo: Graduação.

Instituição de realização: Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos, Centro de Biotecnologia, UFRGS

Projeto: Análise estrutural dos oligômeros formados pelas subunidades recombinantes AgB8/4 e AgB8/5 do antígeno B de *Echinococcus granulosus*

Orientador: Prof. Dr Arnaldo Zaha

2010/2º sem. Estágio curricular

Vínculo: Graduação.

Instituição de realização: Colégio Estadual Paula Soares

Estágio de Docência em Biologia

Supervisor: Prof. Dra Russel Teresinha Dutra da Rosa

2011/1º sem. Estágio curricular
Vínculo: Graduação.
Instituição de realização: Escola Estadual de 1º grau Prof. Leopolda Barnewitz
Estágio de Docência em Ciências
Supervisor: Prof. Heloisa Junqueira

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

2011 Destaque na Sessão Genética Molecular III do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS.

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

CANCELA, M.; RUÉTALO, N.; DELL'OCA, N.; DA SILVA, E. D.; SMIRCICH, P.; RINALDI, G.; ROCHE, L.; CARMONA, C.; ALVAREZ-VALÍN, F.; ZAHA, A.; TORT, J. F. Survey of transcripts expressed by the invasive juvenile stage of the liver fluke *Fasciola hepatica*. **BMC Genomics**. v.11, p.227 - , 2010.

CANCELA, M.; ACOSTA, D.; RINALDI, G.; DA SILVA, E. D., DURÁN, R.; ROCHE, L.; ZAHA, A.; CARMONA, C.; TORT, J. F. A distinctive repertoire of cathepsins is expressed by juvenile invasive *Fasciola hepatica*. **Biochimie**, v.90, p.1461 - 1475, 2008.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

DA SILVA, E. D., FERMINO, F. Z., CANCELA, M, FERREIRA, H. B., ZAHA, A. Cellular viability analysis of cultured cell lines exposed to *Echinococcus granulosus* antigen B. In: 8th International Conference on Lipid Binding Protein, 2013, La Plata. **Conference Program and Abstracts**. La Plata: 2013. p.34.

DA SILVA, E. D., FERMINO, F. Z., CANCELA, M, FERREIRA, H. B., ZAHA, A. Efeito do Antígeno B de *Echinococcus granulosus* sobre células de mamífero em cultura. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul, 2013, Florianópolis. **CD de resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercosul**. 2013.

DA SILVA, E. D., CANCELA, M., MONTEIRO, K. M., FERREIRA, H. B., ZAHA, A. Structural analysis of oligomers formed by recombinant subunits AgB8/4 and AgB8/5 of antigen B from *Echinococcus granulosus*. In: XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro. **XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society of Tropical Medicine**. 2012. v.II. p.623 - 1155

DA SILVA, E. D., ZAHA, A. Análise estrutural dos oligômeros formados pelas subunidades recombinantes AgB8/4 e AgB8/5 do antígeno B de *Echinococcus granulosus*. In: XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2011, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XXIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS**. 2011.

DA SILVA, E. D., CANCELA, M, MONTEIRO, K. M., ZAHA, A. Estudo dos oligômeros recombinantes das subunidades 4 e 5 do Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. In: XXII Salão de Iniciação Científica, 2010, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XXII Salão de Iniciação Científica, XIX Feira de Iniciação à Inovação e ao Desenvolvimento Tecnológico e V Salão UFRGS Jovem**. 2010.

DA SILVA, E. D., CANCELA, M, ZAHA, A. Produção e caracterização das subunidades recombinantes de AgB8/4 e AgB8/5 do Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. In: XXI Salão de Iniciação Científica, 2009, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XXI Salão de Iniciação Científica, XVIII Feira de Iniciação Científica e IV Salão UFRGS Jovem**. 2009.

DA SILVA, E. D., CANCELA, M, ZAHA, A. Expressão e caracterização das subunidades recombinantes de AgB8/4 e AgB8/5 do Antígeno B de *Echinococcus granulosus*. In: XX Salão de Iniciação Científica, XVII Feira de Iniciação Científica e III Salão UFRGS Jovem, 2008, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XX Salão de Iniciação Científica, XVII Feira de Iniciação Científica e III Salão UFRGS Jovem**. 2008.

CANCELA, M, ACOSTA, D, DA SILVA, E. D., RINALDI, G, ROCHE, L, BIZARRO, C., FERREIRA, H. B., CARMONA, C, TORT, J, ZAHA, A. Analysis of genes expressed during invasion process in the trematode *Fasciola hepatica*. In: XX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2007, Recife. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Parasitologia**. 2007.

DA SILVA, E. D., CANCELA, M, ZAHA, A. Estudo da expressão de catepsinas L nos diferentes estágios do ciclo de vida de *Fasciola hepatica* e sua importância no processo de invasão In: XIX Salão de Iniciação Científica, XVI Feira de Iniciação Científica e II Salão UFRGS Jovem, 2007, Porto Alegre. **Livro de Resumos do XIX Salão de Iniciação Científica, XVI Feira de Iniciação Científica e II Salão UFRGS Jovem**. 2007.